

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



02

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

Internationale Patentklassifikation 7 :

G01N 21/64, G02B 21/18, G01N 15/14

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/68667

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

16. November 2000 (16.11.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04115

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Mai 2000 (08.05.00)

(30) Prioritätsdaten:  
199 21 127.2 7. Mai 1999 (07.05.99) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): META-  
SYSTEMS HARD & SOFTWARE GMBH [DE/DE];  
Robert-Bosch-Strasse 6, D-68804 Altussheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖRCH, Thomas [DE/DE];  
In der Holzrott 6, D-68799 Reilingen (DE). PLESCH, An-  
dreas [DE/DE]; Schaelzigweg 78, D-68723 Schwetzingen  
(DE).

(74) Anwalt: SCHIUMA, Daniele; Müller-Boré & Partner, Grafing-  
er Strasse 2, D-81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO  
Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,  
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: MICROSCOPIC SYSTEMS FOR OPTICALLY SCANNING MICROSCOPIC OBJECTS

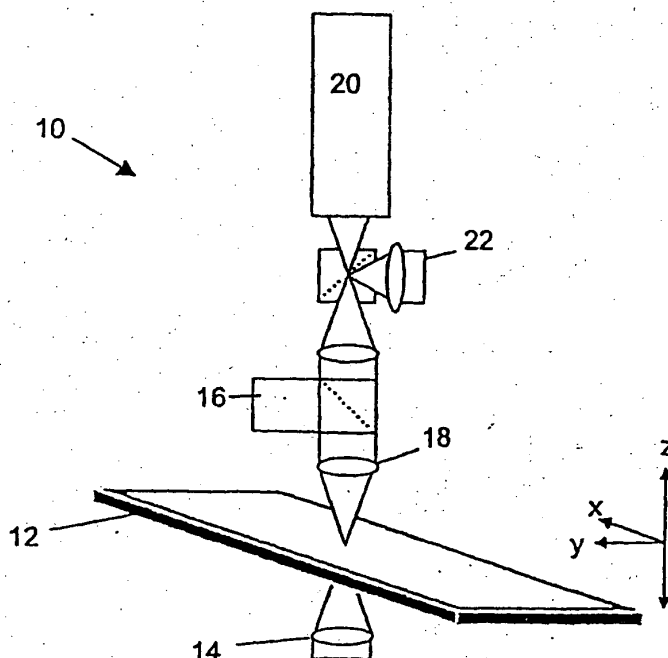
(54) Bezeichnung: MIKROSKOPSYSTEME ZUR OPTISCHEN ABTASTUNG VON MIKROSKOPISCHEN OBJEKTEN

(57) Abstract

The invention relates to a microscopic system for optically scanning objects, especially under fluorescence conditions. The inventive system comprises at least two, preferably electric, electronic and/or photographic, image detecting devices (40, 42, 44) which are configured for the simultaneous storage-capable detection of a detection area pertaining to an object.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt ein Mikroskopsystem zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, welches zumindest zwei bevorzugt elektrische, elektronische und/oder fotografische Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) umfasst, die zur gleichzeitigen speicherfähigen Detektion eines Detektionsbereichs des Objekts ausgelegt sind.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Mikroskopsysteme zur optischen Abtastung von mikroskopischen Objekten

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mikroskopsysteme zur optischen Abtastung von mikroskopischen Objekten, wie sie in den Ansprüchen 1 und 8 beschrieben sind, ein entsprechendes Verfahren zur optischen Abtastung, wie es in Anspruch 9 beschrieben ist sowie die Verwendung des Mikroskopsystems, wie es in Anspruch 11  
5 beschrieben ist.

Für eine Vielzahl von Anwendungen in verschiedensten Technologiebereichen, insbesondere in der biologischen und medizinischen Forschung, ist eine automatisierte Abtastung eines zu untersuchenden Objektes (z.B. Objektträgers) erforderlich.  
10 lich. Herkömmlicherweise wird dies mit Hilfe eines motorisierten Mikroskops so realisiert, daß der Objektträger mittels eines motorisierten Objektverschiebetisches in x- und y-Richtung, z.B. mäanderförmig unter dem Objekt verfahren wird und von einer CCD-Kamera sukzessive erfaßt wird. Die Geschwindigkeit der automatischen Abtastung mikroskopischer Präparate ist insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, d.h. unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops, durch folgende  
15 Faktoren limitiert:

1. Die Signalintensitäten von Fluoreszenzsignalen von mikrobiologischen Präparaten sind teilweise verhältnismäßig klein. Insbesondere bei hohen Ver-  
20 größerungen ist daher für eine ausreichende Bildqualität eine vergleichsweise lange Integrations- bzw. Detektionszeit solcher Signale notwendig, welche teilweise einige Sekunden betragen kann.
2. Vielfach müssen Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen in dem  
25 gleichen Bild- bzw. Detektionsbereich eines mikroskopischen Objekts untersucht werden. Dies ist insbesondere bei mikrobiologischen Objekten der Fall, die mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Fluorochromen präpariert

worden sind. In solchen Fällen muß der gleiche Detektionsbereich mehrmals unter Verwendung der für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff geeigneten Filterkombination des Mikroskops aufgenommen werden. Farbkameras, die drei Farbkanäle (rot R, grün G, blau B) gleichzeitig aufnehmen können, sind hierzu ungeeignet, da zum einen die integrierten R,G,B-Filter nicht an die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe angepaßt sind, und da es zum anderen nicht möglich ist, die Detektionszeit für die einzelnen Farbkanäle individuell zu steuern. Dies ist aber angesichts der erheblichen Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten von beispielsweise DAPI-Gegenfärbung und Hybridisierungssignalen im Fall von FISH zwingend erforderlich.

3. Wird ein motorisierter Objektverschiebetisch für ein schrittartiges Abrastern bzw. "Scannen" eines mikroskopischen Objekts verwendet, so muß nach einem Anhalten des Objektverschiebetischs eine für den Objektverschiebetisch charakteristische Einschwingzeit abgewartet werden, um eine Bewegungsunschärfe, d.h. ein "Verwackeln" eines zu detektierenden Bildes zu vermeiden. Eine solche Bewegungsunschärfe würde sich ansonsten zwangsläufig bei den herkömmlicherweise verwendeten Detektionszeiten von CCD-Kameras ergeben.

Angesichts der obigen geschwindigkeitsbegrenzenden Faktoren ist es daher eine Aufgabe der Erfindung, die Abtastgeschwindigkeit eines Objekts zu erhöhen, ohne dabei einen Verlust an Bildqualität hinnehmen zu müssen. Vorzugsweise soll die Abtastgeschwindigkeit bzw. -rate nur durch die minimale, zur Bilddetektion notwendige Detektionszeit limitiert sein. Es ist ferner eine Aufgabe der Erfindung, ein entsprechendes Verfahren zur optischen Abtastung von Objekten und Verwendungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung anzugeben.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Mikroskopsystem mit den in Anspruch 1 und 8 angegebenen Merkmalen, durch ein Verfahren zur optischen Abtastung von Objekten, welches die Merkmale von Anspruch 9 aufweist, und durch eine Verwendung mit den Merkmalen des Anspruchs 11 gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen ausgeführt.

Erfindungsgemäß umfaßt ein Mikroskopsystem zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, zumindest zwei bevorzugt elektrische, elektronische und/oder photographische Bilddetektionseinrichtungen, die zur gleichzeitigen speicherfähigen Detektion eines Detektionsbereichs des Objekts ausgelegt sind. Um den Detektionbereich des Objekts zu detektieren, verwenden die Bilddetektionseinrichtungen vorzugsweise einen Teil eines optischen Aufnahmesystems des Mikroskops gemeinsam. Beispielsweise kann ein objektivseitiger Teil des Aufnahmesystems von allen Bilddetektionseinrichtungen zur Detektion verwendet werden, wohingegen Teile des Aufnahmesystems auf der Seite der Bilddetektionseinrichtungen auseinanderfallen. Das erfindungsgemäße Mikroskopsystem mit den zumindest zwei Bilddetektionseinrichtungen weist insbesondere durch die mögliche simultane und zeitgünstige Detektion des Objekts durch die mehreren Bilddetektionseinrichtungen erhebliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Mikroskopsystemen auf.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Bilddetektionseinrichtungen zumindest eine vorzugsweise hochauflösende CCD-Kamera, insbesondere sogenannte Megapixelkameras, d.h. CCD-Kameras, welche mehr als  $10^6$  bildauflösende Pixel aufweisen. Vorzugsweise sind die Bilddetektionseinrichtungen ferner derart ausgelegt, daß jeweilige Detektionszeitdauern unabhängig voneinander einstellbar sind. So kann einerseits die Integrations- bzw. Akkumulationszeit des CCD-Arrays bei kleinen, zu detektierenden Intensitäten verlängert werden, wobei die Ausleserate der CCD geeignet angepaßt wird. Andererseits kann bei großen Detektionssignalintensitäten, welche bei normalen Detektionszeitdauern zu einem Saturieren bzw. Überstrahlen der CCD führen würden, die Detektionszeitdauer, d.h. die Integrations- bzw. Akkumulationszeitdauer, der CCD verkürzt werden. Durch diesen "elektronischen Shutter bzw. Verschuß" der Bilddetektionseinrichtung wird eine mechanische Blendenanordnung zur Abschwächung großer Detektionsintensitäten zumeist überflüssig, wodurch sich eine einfachere und kostengünstigere Lösung ergibt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform detektiert eine erste der Bilddetektionseinrichtungen den Detektionsbereich in einer ersten Objektfokusebene und

eine zweite der Bilddetektionseinrichtungen den Detektionsbereich in einer zweiten Objektfokusebene, wobei die erste und die zweite Objektfokusebene relativ zueinander entlang einer optischen Detektionsachse des Mikroskopsystems versetzt sind. Hierdurch kann eine simultane Detektion des optisch abzutastenden Objekts in unterschiedlichen Fokusebenen erfolgen, d.h. es können unterschiedliche Tiefenschichten des Objekts untersucht werden. Die Objekt- bzw. Gegenstandsebenen, welche fokussiert bzw. scharf von den zumindest zwei Bilddetektionseinrichtungen detektiert werden, sind somit entlang der optischen Detektionsachse des Mikroskopsystems voneinander beabstandet. Die von den Bilddetektionseinrichtungen erhaltenen speicherfähigen Bilder bzw. Signale können nachfolgend in ein sogenanntes "extended focus"-Bild bzw. Projektionsbild umgerechnet werden, um die unterschiedlichen detektierten Ebenen des Objekts insbesondere in einem Bild darzustellen. Bei der Berechnung des Projektionsbildes aus den einzelnen Bildern bzw. Signalen der Bilddetektionseinrichtungen kann auf bekannte Algorithmen zur Erzeugung eines Projektionsbildes aus Bildern mehreren Tiefenschichten zurückgegriffen werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erste und die zweite Bilddetektionseinrichtung um unterschiedliche geometrische Weglängen entlang der jeweiligen optischen Detektionspfade von der ersten Objektfokusebene beabstandet. Um unterschiedliche Objektfokusebenen des Objekts mit der ersten und der zweiten Bilddetektionseinrichtung scharf bzw. fokussiert abzubilden, können die Bilddetektionseinrichtungen im Strahlengang des Mikroskopsystems derart versetzt sein, daß die geometrischen Weglängen entlang der jeweiligen Detektionspfade unterschiedlich lang sind. Durch ein derartiges Versetzen der Bilddetektionseinrichtungen insbesondere auf der Bildseite des Mikroskopsystems, welche entlang des Detektionsstrahlengangs hinter dem optischen Abbildungs- bzw. Linsensystem liegt, werden unterschiedliche Tiefenebenen des Objekts von den Bilddetektionseinrichtungen scharf erfaßt. Die Tiefen- bzw. Objektfokusebenen können hierbei sehr dicht angeordnet sein und beispielsweise nur um Bruchteile eines Mikrometers voneinander beabstandet sein.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt zumindest eine der

Bilddetektionseinrichtungen eine Zusatzoptik zur Einstellung der jeweiligen Objektfokusebene. Die Zusatzoptik ist insbesondere eine optische Linse bzw. ein Linsensystem, welches derart in dem Detektionsstrahlengang des Mikroskopsystems angeordnet wird, daß - insbesondere auch ohne das oben beschriebene Versetzen der Bilddetektionseinrichtungen - unterschiedliche Fokus- bzw. Tiefenebenen des Objekts scharf bzw. fokussiert abgebildet werden. Beispielsweise ist die Zusatzoptik im optischen Detektionspfad lediglich der ersten Bilddetektionseinrichtung angeordnet und liegt folglich nur im Detektionsstrahlengang zwischen dem zu detektierenden Objekt und der ersten Bilddetektionseinrichtung, während die zweite Bilddetektionseinrichtung das Objekt ohne die Zusatzoptik detektieren wird. Vorzugsweise ist die Zusatzoptik unmittelbar vor zumindest einer der Vielzahl der Bilddetektionseinrichtungen angeordnet.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine erste der Bilddetektionseinrichtungen zur Detektion eines ersten und eine zweite der Bilddetektionseinrichtungen zur Detektion eines zweiten optischen Wellenlängenbereichs ausgelegt. Dies ist insbesondere für Fluoreszenzanwendungen eines Mikroskopsystems vorteilhaft, bei welchen das mikroskopische Objekt mit mehreren zu detektierenden Fluoreszenzfarbstoffen präpariert wurde, die ihre Emissionsbanden in unterschiedlichen optischen Wellenlängenbereichen aufweisen. Die erfindungsgemäße Bereitstellung von zumindest zwei Bilddetektionseinrichtungen ermöglicht somit eine simultane Detektion des Detektionsbereichs des Objekts in mehreren optischen Wellenlängenbereichen, wodurch sich eine spürbare Verbesserung der Abtastgeschwindigkeit bzw. -rate im Vergleich zu herkömmlichen, sequentiell arbeitenden Mikroskopsystemen ergibt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erste Bilddetektionseinrichtung eine erste Kamera und einen dichroitischen Strahlteiler und die zweite Bilddetektionseinrichtung eine zweite Kamera, wobei der Strahlteiler derart ausgelegt und im Detektionsstrahlengang angeordnet ist, daß Detektionsstrahlen des Detektionsbereichs in dem ersten Wellenlängenbereich per Transmission durch den Strahlteiler auf die erste Kamera und Detektionsstrahlen des Detektionsbereichs in dem zweiten Wellenlängenbereich per Reflexion an dem Strahlteiler auf



- die zweite Kamera fallen. Diese besonders für Fluoreszenzanwendungen vorteilhafte Ausführungsform gestattet somit prinzipiell die Verwendung von baugleichen Kameras, insbesondere hochauflösende CCD-Kameras, da die Wellenlängenbereichselektion durch den dichroitischen Strahlteiler vorgenommen wird. Sollen Emissionsbanden von Fluoreszenzfarbstoffen in drei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen detektiert werden, so können drei Kameras mit zwei dichroitischen Strahlteilern bereitgestellt werden. Eine Erweiterung auf mehr als drei Kameras ist ebenfalls möglich.
- 10 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung umfaßt ein Mikroskopsystem zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, zumindest eine Objektbeleuchtungseinrichtung, zumindest eine Bilddetektionseinrichtung zur Detektion von Detektionsbereichen des Objekts innerhalb einer Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$  und eine Objektverschiebeeinrichtung zur Verschiebung des
- 15 Objekts,
- wobei die Objektverschiebeeinrichtung zu einer Verschiebung des Objekts mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit ausgelegt ist, so daß nach einer Verschiebezeit  $t_{\text{verschieb}}$  das Objekt um einen Detektionsbereich bzw. um eine maximale Länge des Detektionsbereichs in Verschieberichtung verschoben ist, wobei  $t_{\text{detektion}}$  einen
- 20 Bruchteil von  $t_{\text{verschieb}}$  beträgt. Eine solche Verkürzung der Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$  ist insbesondere bei Transmissions- bzw. Durchlichtuntersuchungen vorteilhaft. Ein derartiges Mikroskopsystem gestattet es demgemäß, einen Detektionsbereich des Objekts zu detektieren, selbst wenn sich dieses bewegen sollte, da eine eventuelle Bewegung durch die im Vergleich zur Verschiebezeit  $t_{\text{verschieb}}$  kleinen
- 25 Detektionszeit  $t_{\text{detektion}}$  "eingefroren" wird. Auf diese Weise wird so einer Bewegungsunschärfe eines detektierten Bildes wirkungsvoll begegnet. Folglich kann die Detektion von Detektionsbereichen des Objekts mit der maximal mechanisch möglichen Verschieberate der Objektverschiebeeinrichtung erfolgen (typischerweise etwa 10 Detektionsbereiche bzw. -positionen pro Sekunde), ohne die
- 30 Einschwingzeit des Objekts bzw. der Objektverschiebeeinrichtung abwarten zu müssen. Eine eventuell reduzierte Intensität des von der Bilddetektionseinrichtung detektierten Bildsignals läßt sich oft durch einen entsprechend erhöhten Beleuchtungspegel wieder anheben. Es ist folglich nicht notwendig, das Objekt mit einer

- Objektverschiebeeinrichtung schrittweise, d.h. in einem Start-/Stopbetrieb, zu verschieben, um eine Bilddetektion lediglich in Ruhezuständen des Objektes vorzunehmen. Statt dessen kann das mikroskopische Objekt kontinuierlich (z.B. gleichförmig mit konstanter Geschwindigkeit) bewegt werden, wodurch ein Ab-
- 5 warten einer Einschwingzeit der Objektverschiebeeinrichtung sowie eine Beschleunigungs- und Abbremszeit derselben im Vergleich zu herkömmlichen Mikroskopsystemen hinfällig ist. Vorteilhafterweise läßt sich daher eine gesteigerte Abtastgeschwindigkeit des Objekts erzielen.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Mikroskopsystems ist die Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}} \leq t_{\text{verschieb}}/500$ , vorzugsweise  $t_{\text{detektion}} \leq t_{\text{verschieb}}/1000$ . Vorzugsweise ist die Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$  kleiner als 1 msec, vorzugsweise kleiner als 0,1 msec.
- 15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Objektverschiebeeinrichtungen zur zumindest zweidimensionalen Verschiebung des Objekts senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopsystems ausgelegt (x- und y-Richtung). Vorteilhafterweise ermöglicht die Objektverschiebeeinrichtung jedoch ebenfalls eine Verschiebung des Objekts entlang der optischen Achse (z-Richtung), was insbesondere zur automatisierten Abtastung "dicker" Objekte vorteilhaft ist.
- 20

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Objektverschiebeeinrichtung einen Objektverschiebetisch und einen diesen verschiebenden elektrischen Verschiebemotor.

25

- Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Mikroskopsystem mit einer Steuereinrichtung bereitgestellt, die mit der Objektbeleuchtungseinrichtung, der Bilddetektionseinrichtung und der Objektverschiebeeinrichtung in Signalverbindung steht und ein automatisches (d.h. unbeaufsichtigtes)
- 30 optisches Abtasten eines mehrere Detektionsbereiche bzw. Bildfelder umfassenden Bereichs des Objekts steuert. Hierdurch kann vorteilhafterweise mit hoher optischer Abtastgeschwindigkeit eine automatische Abtastung bzw. Detektion des mikroskopischen Objekts erfolgen, ohne daß Benutzereingriffe während dieses

Vorgangs notwendig wären.

Gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, vorzugsweise mittels eines wie  
5 vorstehend definierten Mikroskopsystems bereitgestellt, wobei ein Detektionsbereich des Objekts mit zumindest zwei Bilddetektionseinrichtungen gleichzeitig speicherfähig detektiert wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens  
10 detektieren die Bilddetektionseinrichtungen den Detektionsbereich gleichzeitig in zumindest zwei unterschiedlichen Objektfokusebenen, welche entlang einer optischen Detektionsachse des Mikroskopsystems versetzt sind, und/oder den Detektionsbereich in zumindest zwei zumindest bereichsweise unterschiedlichen optischen Wellenlängenbereichen.

15 Das erfindungsgemäße Mikroskopsystem und das erfindungsgemäße Verfahren können vorzugsweise in allen Anwendungen eingesetzt werden, bei denen das automatische Absuchen bzw. Abtasten von Mikroskoppräparaten sowie die (zumindest teil-) automatische Auswertung von Objekten eines bestimmten Typs von  
20 Bedeutung sind. Solche Anforderungsprofile sind insbesondere in der medizinischen Forschung anzutreffen.

Eine bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung betrifft die Detektion von markiertem, insbesondere fluoreszenzmarkiertem biologischem  
25 Material in einer Probe. Der Begriff "biologisches Material" umfaßt sämtliches biologisches Material sowie die dieses Material aufbauenden Stoffe, beispielsweise Viren, Viroide, mehrzellige und einzellige Organismen, insbesondere Zellen, beispielsweise Bakterien, Zellen im Gewebeverband oder Kulturzellen, deren Bestandteile wie Zellorganellen, beispielsweise Zellkerne, Mitochondrien, Plastiden, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Dictyosomen, Ribosomen usw., genetisches Material  
30 wie Chromosomen und deren Bestandteile, Nukleinsäuren wie DNA und RNA, Proteine wie Strukturproteine, Enzyme und Antikörper, Polysaccharide und Lipide.

Ein bevorzugtes Beispiel der vorstehend definierten Verwendung betrifft die Suche nach "seltenen" Ereignissen, wie der Suche nach wenigem aufzufindendem fluoreszenzmarkiertem biologischem Material in einer Probe. Der Begriff "seltenes Ereignis" bedeutet, daß das Verhältnis von nicht-markiertem zu dem markierten biologischen Material in der Probe mehr als  $10^4$ , insbesondere mehr als  $10^6$  beträgt. So kann das Verhältnis von nicht-markiertem zu dem markierten biologischen Material in der Probe bei der Pränataldiagnostik ca.  $10^8$  und bei der Tumordiagnostik ca.  $10^6$  betragen.

- 10 Der Begriff "markiert" bedeutet, daß das zu untersuchende Material mit Hilfe des erfindungsgemäßen Mikroskopsystems detektierbar ist. Insbesondere umfaßt die Markierung eine, mehr bevorzugt mehrere unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen. Bevorzugte Fluoreszenzmarkierungen sind beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe der Cy-Familie, Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Nukleinsäure-bindende
- 15 Fluoreszenzfarbstoffe wie DAPI (4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) und Hoechst 33342 usw. Das zu detektierende biologische Material kann dabei direkt mit einem spezifischen Farbstoff markiert werden, beispielsweise die DNA in einem Zellkern mittels DAPI, und/oder indirekt markiert werden, beispielsweise mittels einer oder mehreren unterschiedlich spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Nukleinsäuresonden (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, FISH) und/oder mittels
- 20 fluoreszenzgekoppelter Antikörper, die monoklonal oder polyklonal sein können.

- Ein Beispiel für die vorstehend definierte Verwendung ist die Suche von einigen wenigen angefärbten Zellen eines bestimmten Phänotyps in einer großen Zell-
- 25 population. Wie vorstehend ausgeführt, können die zu detektierenden Zellen beispielsweise mit Hilfe eines fluoreszenzgekoppelten Antikörpers selektiv markiert sein. Im allgemeinen ist eine solche Markierung jedoch nicht absolut spezifisch, d.h. es werden auch Zellen angefärbt, die nicht den gesuchten Phänotyp aufweisen (falsch-positive Zellen). Um die Spezifität der Antikörpermarkierung zu
- 30 erhöhen, können mehrere unabhängige, gegen denselben Zelltyp gerichtete und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper gleichzeitig eingesetzt werden. In anderen Anwendungen können falsch-positive Ergebnisse auch über die zusätzliche Analyse morphometrischer Parameter, beispielsweise

über Form und/oder Fläche einer Gegenfärbung des Zellkern mit Hilfe eines Nukleinsäure-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes (z.B. DAPI) erkannt und ausgesondert werden. Bevorzugte Anwendungen einer solchen Suche nach "seltenen" Ereignissen betreffen beispielsweise die Tumordiagnostik wie die Suche nach Mikrometastasen in Blut oder Knochenmark oder die Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen, wobei das Verhältnis von nicht-markierten zu markierten Zellen häufig im Bereich von etwa  $10^6$  liegt, sowie die Identifikation von im mütterlichen Blut zirkulierenden foetalen Zellen bei der nicht-invasiven genetischen Pränataldiagnostik, wobei das Verhältnis von nicht-markierten zu markierten Zellen häufig im Bereich von etwa  $10^8$  liegt.

Ein weiteres Beispiel für eine bevorzugte Verwendung des erfindungsgemäßen Mikroskopsystems und des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft das Auszählen von FISH-Signalen bzw. FISH-Spots in einer großen Anzahl von Zellkernen. Hierbei ist es erforderlich, in verschiedenen Fluoreszenzkanälen Bilder aus mehreren Fokusebenen aufzunehmen und anschließend in ein wie vorstehend beschriebenes "extended focus"-Bild bzw. Projektionsbild umzurechnen, um die Signale aus verschiedenen Ebenen der dreidimensionalen Kerne zu erfassen. Die so gewonnenen Projektionsbilder werden anschließend verwendet, um die Anzahl von Fluoreszenzsignalen zu ermitteln, beispielsweise um Abweichungen der Chromosomenzahl festzustellen. In anderen Anwendungen kann der Abstand zwischen von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ausgehenden FISH-Signalen bestimmt werden. Dies erlaubt beispielsweise die Erkennung von Chromosomenaberrationen wie Fusionen verschiedener, die Bruchpunkte flankierender Signale als Folge von Translokationen wie z.B. der Translokation 9/22 (Philadelphia-Chromosom) bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML).

Weitere Anwendungen betreffen die Analyse von Proben in der Immunologie, Bakteriologie, Virologie usw., beispielsweise die Erkennung markierter Bakterien, Viren und anderer infektiöser Partikel.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf begleitende Zeichnungen beispielhaft beschrieben. Es zeigen

Figur 1 eine schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Ausführungsform eines Mikroskopsystems;

Figur 2 eine schematische Prinzipanordnung einer erfindungsgemäßen Ausführungsform eines Mikroskopsystems mit einem als Beleuchtungsmanipulator ausgebildeten afokalen Relay-System; und

Figur 3 eine schematische Ansicht einer Ausführungsform eines Mikroskopsystems mit drei Bilddetektionseinrichtungen, die über wellenlängensensitive, dichroitische Strahlteiler angesteuert werden.

10

In Figur 1 ist der Aufbau eines Mikroskopsystems 10 gemäß einer Ausführungsform der Erfindung schematisch dargestellt. Das Mikroskopsystem umfaßt einen in alle Raumrichtungen verschiebbaren Objektverschiebetisch 12, welcher mit einem nicht dargestellten elektrischen Verschiebemotor bereitgestellt ist. Der Verschiebemotor und der Objektverschiebetisch 12 bilden eine Objektverschiebeeinrichtung. Das zu untersuchende mikroskopische Objekt ist an dem Objektverschiebetisch festgelegt. Das Mikroskopsystem 10 weist zwei Objektbeleuchtungseinrichtungen auf, wobei eine Durchlichtbeleuchtungseinrichtung 14 und eine zweite mikroskopseitige Beleuchtungseinrichtung (EPI-Beleuchtung) 16 vorgesehen ist. Das Detektionslicht wird von einem Objektiv 18 gesammelt und über ein Linsensystem einer CCD-Kamera 20 zugeführt, die als eine erste Bilddetektionseinrichtung dient. Über einen in den Strahlengang einklappbaren Schwenkspiegel oder einen Strahlteiler läßt sich der Detektionsbereich des zu untersuchenden Objekts auch über ein Okular 22 direkt visuell betrachten. Die nicht näher dargestellten Objektbeleuchtungseinrichtungen (14, 16), der Verschiebemotor des Objektverschiebetisches 12 sowie die CCD-Kamera 20 sind mit einer nicht dargestellten externen Steuereinrichtung verbunden.

Die Objektbeleuchtungseinrichtung 16 ist insbesondere für eine gepulste Beleuchtung (ähnlich einer Blitz- bzw. Stroboskopbeleuchtung) ausgelegt und kann bei hoher Puls-Wiederholfrequenz ca.  $t_{\text{puls}} = 0,1$  msec lange Beleuchtungspulse emittieren. Die CCD-Kamera 20 weist z.B. eine Chipauflösung von  $1280 \times 1024$  Bildpunkten auf und kann typischerweise innerhalb von einigen msec ausgelesen

werden.

Wenn ein beispielsweise mikrobiologisches Präparat unter Fluoreszenzbedingungen untersucht werden soll, läßt sich durch die mögliche gepulste Beleuchtung durch  
5 die Objektbeleuchtungseinrichtung 16 eine wesentliche Verkürzung der Integrationszeit bzw. Detektionszeit, die effektiv benötigt wird, erzielen, da sich die erforderliche Lichtenergie in sehr viel kürzerer Zeit als bei der kontinuierlichen Leistungsabgabe einer konventionellen Fluoreszenzbeleuchtung auf das Präparat übertragen läßt. Dies ermöglicht es, vorteilhafterweise den Objektverschiebetisch  
10 12 anstatt des üblichen Start/Stop-Betriebs sogar kontinuierlich zu verfahren, ohne daß verwackelte Aufnahmen aufgrund von Bewegungsunschärfe die Folge sind. Wenn beispielsweise eine Bildunschärfe von 1 Pixel akzeptiert wird, kann der Objektverschiebetisch mit  $10^4$  Pixel/sec verfahren werden, was bei einer CCD-Auflösung von  $1280 \times 1024$  Bildpunkten ca. 10 Detektionsbereichen bzw. Bildfeldern/sec entspricht. Auf die herkömmlicherweise notwendigen Wartepausen für  
15 ein Abschwngen des Objektverschiebetischs kann somit verzichtet werden.

Es hat sich gezeigt, daß ein Verhältnis von Objektbeleuchtungspulsdauer  $t_{\text{puls}}$  zu einer Verschiebezeitdauer  $t_{\text{verschieb}}$  von  $t_{\text{puls}}/t_{\text{verschieb}} \leq 0,5\%$  bereits hinreichend  
20 scharfe Bilder liefert. Die Verschiebezeitdauer  $t_{\text{verschieb}}$  ist hierbei diejenige Zeit, während welcher das Objekt in seiner Verschieberichtung durch den Objektverschiebetisch 12 verschoben werden muß, um um einen Detektionsbereich bzw. um die maximale Länge des Detektionsbereichs in Verschieberichtung verschoben zu werden.

25 Demgemäß umfaßt vorzugsweise das Mikroskopsystem 10 zur optischen Abtastung von (mikroskopischen) Objekten bzw. Präparaten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, zumindest eine Objektbeleuchtungseinrichtung 14, 16, zumindest eine Bilddetektionseinrichtung 20 zur Detektion von Detektionsbereichen des Objektes und eine Objektverschiebeeinrichtung 12 zur Verschiebung des Objektes,  
30

wobei die Objektverschiebeeinrichtung 12 zu einer Verschiebung des Objektes mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit ausgelegt ist, so daß nach einer Verschiebe-

zeitdauer  $t_{\text{verschieb}}$  das Objekt um einen Detektionsbereich bzw. um die maximale Detektionsbereichslänge in Verschieberichtung verschoben ist, und die Objektbeleuchtungseinrichtung 14, 16 zu einer Erzeugung von Objektbeleuchtungspulsen der (jeweiligen) Zeitdauer  $t_{\text{puls}}$  ausgelegt ist, wobei  $t_{\text{puls}}$  einen Bruchteil von  $t_{\text{verschieb}}$  beträgt.

Weist der Detektionsbereich beispielsweise eine rechteckige Gestalt auf, so ist die Objektverschiebeeinrichtung 12 dazu ausgelegt, das Objekt innerhalb der Zeit  $t_{\text{verschieb}}$  um die maximale Länge des rechteckigen Detektionsbereichs in Verschieberichtung zu verschieben. Verläuft die Verschieberichtung beispielsweise parallel zu einer Seitenkante des Detektionsbereichs, so entspricht diese maximale Länge dieser Kantenlänge. Da die Zeitdauer  $t_{\text{puls}}$  des Objektbeleuchtungspulses lediglich einen Bruchteil dieser Verschiebezeitdauer  $t_{\text{verschieb}}$  beträgt, ergibt sich selbst dann ein qualitativ hochwertiges, von der Bilddetektionseinrichtung 20 detektiertes Bild, wenn sich das Objekt während der Detektion bewegen sollte. Demgemäß wird durch die gepulste Beleuchtung (ähnlich einer Blitz- bzw. Stroboskop-Beleuchtung) die Bewegungsunschärfe bzw. eine "Verwackelungsgefahr" eines zu detektierenden Bildes wirkungsvoll vermieden.

Vorzugsweise ist die Zeitdauer der Objektbeleuchtungspulse  $t_{\text{puls}} \leq t_{\text{verschieb}}/500$ , vorzugsweise  $t_{\text{puls}} \leq t_{\text{verschieb}}/1000$ . Vorzugsweise wird die Zeitdauer  $t_{\text{puls}}$  der Objektbeleuchtungspulse kleiner als 1 msec, vorzugsweise kleiner als 0,1 msec gewählt.

Demgemäß umfaßt ein Verfahren zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, mittels eines (vorzugsweise erfindungsgemäßen) Mikroskopsystems, welches zumindest eine Objektbeleuchtungseinrichtung, zumindest eine Bilddetektionseinrichtung zur Detektion von Detektionsbereichen des Objekts und eine elektrisch angetriebene Objektverschiebeeinrichtung zur Verschiebung des Objekts umfaßt, die folgenden Schritte in dieser Reihenfolge:

- (a) Rücksetzen eines Bildsignalspeichers der Bilddetektionseinrichtung und Einstellen eines Zeitzählers  $\text{timer} = t_0$ ;
- (b) zum Zeitpunkt  $\text{timer} = t_0 + t_{\text{verschieb}}$  des Zeitzählers Beleuchten eines Detek-



tionsbereichs des Objekts mit einem Objektbeleuchtungspuls der Zeitdauer  $t_{\text{puls}}$  und

- (c) Auslesen eines zeitintegrierten Bildsignals aus dem Bildsignalspeicher der Bilddetektionseinrichtung,

- 5 wobei das Objekt während aller Schritte (a) bis (c) kontinuierlich durch die elektrische Objektverschiebeeinrichtung derart verschoben wird, daß nach der Verschiebezeitdauer  $t_{\text{verschieb}}$  das Objekt um einen Detektionsbereich bzw. um eine maximale Länge des Detektionsbereichs in Verschieberichtung verschoben ist, und die Pulszeitdauer  $t_{\text{puls}}$  derart gewählt wird, daß  $t_{\text{puls}}$  einen Bruchteil von  $t_{\text{verschieb}}$   
10 beträgt.

- Vorzugsweise ist die kontinuierliche Verschiebung des Objekts durch die elektrische Objektverschiebeeinrichtung 12 eine gleichförmige Verschiebebewegung mit konstanter Geschwindigkeit, jedoch kann sich das Objekt zum Zeitpunkt der  
15 Pulsbeleuchtung auch langsamer bewegen oder sich im Stillstand befinden. Da die Pulszeitdauer  $t_{\text{puls}}$  lediglich einen Bruchteil von  $t_{\text{verschieb}}$  beträgt, kann ein qualitativ hochwertiges, zeitintegriertes Bildsignal durch die Bilddetektionseinrichtung 20 auch dann gewonnen werden, wenn sich das Objekt während der detektierenden Integration des Bildes bewegt, ohne daß eine spürbare Beeinträchtigung durch  
20 Bewegungsunschärfe resultieren würde. Folglich gestattet das Verfahren vorteilhafterweise eine optische Abtastung von Objekten mit einer erhöhten Abtastrate, da auf Ab- bzw. Einschwingprobleme der Objektverschiebeeinrichtung 12 sowie auf sonstige Bewegungsunschärfeprobleme nicht durch ein nachteiliges Abwarten einer charakteristischen Einschwingzeit reagiert werden muß. Stattdessen wird die  
25 Abtastrate des erfindungsgemäßen Verfahrens lediglich durch die Verschiebegeschwindigkeit der Objektverschiebeeinrichtung 12 bzw. durch die mindestens notwendige Detektionszeit begrenzt. Vorzugsweise ist  $t_{\text{puls}}$  kleiner oder gleich wie  $t_{\text{verschieb}}/500$ , vorzugsweise  $t_{\text{verschieb}}/1000$ .

- 30 Nachfolgend auf den Schritt (c) des Verfahrens wird vorzugsweise ein zusätzlicher Objektverschiebeschritt (d) durchgeführt, der insbesondere eine andere Objektverschiebegeschwindigkeit und -richtung aufweisen kann. Ein solcher zusätzlicher Objektverschiebeschritt kann vorteilhaft sein, wenn die Detektionsbereiche des

Objekts nicht in Verschieberichtung unmittelbar aneinander angrenzen sollen, sondern durch nichtdetektierte Bereiche des Objekts beabstandet sein sollen. Dies ist insbesondere dann erforderlich, wenn ein "stichpunktartiges" Detektieren verteilter Detektionsbereiche eines Objekts erforderlich sind. Ferner kann in dem

5 Objektverschiebeschritt (d) eine Umkehrung der Verschieberichtung erfolgen, so daß ein mäanderförmiges Abtasten größerer Objekte erfolgen kann.

Zu diesem Zweck können die Verfahrensschritte (a) bis (c) bzw. (a) bis (d) eine vorbestimmte Anzahl von Wiederholungen wiederholt werden, um auf diese Weise

10 eine Vielzahl von Detektionsbereichen des Objekts automatisch zu erkennen.

Insbesondere für Durchlichtuntersuchungen läßt sich die Bewegungsunschärfe wirkungsvoll auch durch eine Verkürzung der Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$  reduzieren. Verwendet man eine CCD-Kamera, die über einen sogenannten elektronischen

15 Shutter, d.h. einen elektronischen Verschuß, verfügt, so läßt sich die Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$ , d.h. die Zeitdauer, während der das einfallende Licht auf dem CCD-Chip gesammelt wird, auf beispielsweise 0,1 msec verkürzen. Eine unter Umständen dadurch reduzierte CCD-Detektionssignalstärke läßt sich vielfach durch einen entsprechend erhöhten Beleuchtungspegel wieder anheben. Die sehr kurze

20 Detektionszeit erlaubt es, ein Bild aufzunehmen, bevor der Objektisch 12 ab- bzw. eingeschwungen ist und damit stabil steht, da, wie bei einer Pulsbeleuchtung, eine eventuelle Restbewegung gewissermaßen "eingefroren" wird. Als Folge kann die Bildaufnahme mit der maximalen, durch den Objektisch 12 bestimmten Verschiebefrequenz erfolgen (typischerweise etwa 10 Detektionsbereiche bzw.

25 positionen pro Sekunde), ohne Einschwingzeiten des Objektischs 12 abwarten zu müssen.

In Figur 2 ist schematisch die Anordnung eines Beleuchtungsmanipulators 24 in dem Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskopsystems dargestellt. Mittels eines

30 Linsensystems 26 wird parallel zur optischen Achse des Mikroskopsystems gerichtetes Anregelicht von einer Lichtquelle 28, die in einem Lampenhaus 30 eingebaut ist, erzeugt. Das Anregelicht trifft auf eine erste Sammellinse 32 des Beleuchtungsmanipulators 24, welcher als ein afokales Relay-System ausgeführt ist. Die

Sammellinse 32 fokussiert das parallele Lichtbündel in einen Brennpunkt auf der optischen Achse des Mikroskopsystems, welcher um den Abstand  $f_2$  von der Hauptebene der Sammellinse 32 entfernt ist. Dieser Brennpunkt fällt mit dem Brennpunkt einer zweiten Sammellinse 34 des Beleuchtungsmanipulators 24 zusammen, welcher nachfolgend wiederum ein zur optischen Achse paralleles Lichtbündel erzeugt, welches weiter in Richtung Mikroskop gerichtet ist. Da die Brennweite  $f_1$  der Sammellinse 34 kleiner als die Brennweite  $f_2$  der Sammellinse 32 ist, wird der ursprüngliche Anregungsstrahldurchmesser  $D_2$  auf den Durchmesser  $D_1$  komprimiert, wobei  $D_1 = D_2 f_1/f_2$ .

Demgemäß kann ein Mikroskopsystem 10 zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen bzw. -anregung, zumindest eine Objektbeleuchtungseinrichtung 28, zumindest eine erste Bilddetektionseinrichtung zur Detektion eines ersten Detektionsbereichs des Objekts und eine zweite Bilddetektionseinrichtung zur Detektion eines zweiten Detektionsbereichs umfassen, welcher den ersten Detektionsbereich im wesentlichen umfaßt, wobei die Objektbeleuchtungseinrichtung 28 einen Beleuchtungsmanipulator 24 zur selektiven Beleuchtung des ersten und/oder des zweiten Detektionsbereichs umfaßt. Der Beleuchtungsmanipulator 24 ermöglicht es demgemäß, den gesamten zweiten Detektionsbereich oder lediglich den ersten Detektionsbereich gezielt zu beleuchten.

Die erste Bilddetektionseinrichtung kann eine CCD-Kamera, die zweite Bilddetektionseinrichtung ein Okular zum direkten optischen Betrachten und der Beleuchtungsmanipulator 24 ein afokales Relay-System bzw. einen Strahlkompressor umfassen. Der Beleuchtungsmanipulator 24 gestattet es demgemäß, den kleinen (ersten) Detektionsbereich der CCD-Kamera selektiv zu beleuchten, ohne gleichzeitig die durch das Okular des Mikroskopsystems sichtbaren umliegenden bzw. anderen Teile des (zweiten) Detektionsbereichs mitbeleuchten zu müssen. Die Verwendung eines afokalen Relay-Systems bzw. eines Strahlkompressors ermöglicht somit vorteilhafterweise eine Konzentration der Anregungsbeleuchtung auf den für eine Detektion mit der CCD-Kamera maßgeblichen (ersten) Detektionsbereich. Im Falle einer Fluoreszenzdetektion von Fluoreszenzfarbstoffen, beispiels-

weise von entsprechend präparierten mikrobiologischen Objekten, wird durch diese Ausführungsform vorteilhafterweise ein unnötig schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe durch ein unnötig großes beleuchtetes Bildfeld vermieden.

- 5 Eine andere Lösung, das Kamerabild an die ausgeleuchtete Fläche des Objekts anzupassen und damit das Anregungslicht optimal zu nutzen, ist einen um den Faktor M verkleinernden Kameraadapter zu verwenden. Hierdurch wird der von der Kamera erfaßte Bildbereich um denselben Faktor M vergrößert. Die Diskrepanz zwischen dem ausgeleuchteten Okularbildfeld und dem Kamerabildfeld reduziert  
10 sich entsprechend. Das (größere) Okularbildfeld bleibt unverändert voll ausgeleuchtet.

Figur 3 zeigt schematisch einen Teil des Strahlengangs einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskopsystems. Hierbei werden drei verschiedene und getrennt ansteuerbare Bilddetektionseinrichtungen eingesetzt, die  
15 als erste 40, zweite 42 und dritte 44 CCD-Kamera ausgebildet sind. Eine Objektbeleuchtungseinrichtung 46, die aus einer Lichtquelle und einem Linsensystem besteht, erzeugt mittels eines ersten Strahlteilers 48 eine Auflichtbeleuchtung auf ein nicht dargestelltes mikroskopisches Objekt.

- 20 Wenn unterschiedliche optische Wellenlängenbereiche durch die Bilddetektionseinrichtungen 40, 42 und 44 gleichzeitig detektiert werden sollen, ist der erste Strahlteiler 48 als ein Drei-Band-Strahlteiler (Triple Band Beam Splitter) ausgebildet, welcher eine hohe Transmission in den optischen Wellenlängenbereichen  $F_1$ ,  $F_2$   
25 und  $F_3$  aufweist. In Verbindung mit der Objektbeleuchtungseinrichtung 46 kann der Strahlteiler 48 beispielsweise zur Simultananregung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fluorochrome in diesen Wellenlängenbereichen dienen.

Im Detektions- bzw. Nachweisstrahlengang des Mikroskopsystems sind zwei  
30 weitere Strahlteiler 50, 52 angeordnet, die das zu detektierende Licht des Detektionsbereichs des Objekts auf die CCD-Kameras 40, 42 und 44 verteilen. Im Fall der beschriebenen simultanen Detektion von mehreren "Farbkanälen" erfolgt eine spektrale Aufspaltung des detektierten Lichts durch eine Verwendung von dichroi-

tischen Strahlteilern. So weist der Strahlteiler 50 einen großen Transmissionskoeffizienten in dem Wellenlängenbereich  $F_1$  auf, reflektiert jedoch die Wellenlängenbereich  $F_2$  und  $F_3$  effektiv. Hierdurch gelangt lediglich zu detektierendes Licht im Wellenlängenbereich  $F_1$  auf die erste CCD-Kamera 40. Der zweite dichroitische Strahlteiler 50 hingegen weist einen hohen Transmissionskoeffizienten im Wellenlängenbereich  $F_3$  auf und einen großen Reflexionskoeffizienten im Wellenlängenbereich  $F_2$ . Demgemäß fällt zu detektierendes Licht im Wellenlängenbereich  $F_2$  auf die zweite CCD-Kamera 42, während zu detektierendes Licht im Wellenlängenbereich  $F_3$  auf die dritte CCD-Kamera 44 fällt. Besonders vorteilhaft ist es, diese Strahlteiler auf die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in ihren spektralen Eigenschaften gezielt anzupassen. Unter eventueller Verwendung von angepaßten Doppel- oder Dreifachanregungsfiltern kann so das Fluoreszenzsignal mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig nachgewiesen werden. Eine herkömmliche sequentielle und damit zeitraubende Detektion des gleichen Detektionsbereichs eines Objekts in verschiedenen Wellenlängenbereichen ist somit hinfällig, da eine Parallelisierung durch eine Mehrkanalaufnahme eine gleichzeitige Detektion der Fluoreszenzsignale in allen relevanten Wellenlängenbereichen ermöglicht.

Einer Verwendung einer einzigen, spektral empfindlichen Bilddetektionseinrichtung ist die erfindungsgemäße Mehrkanalaufnahme mit unterschiedlichen Bilddetektionseinrichtungen überlegen. So können bei der Verwendung von mehreren Bilddetektionseinrichtungen die Detektionsparameter der Bilddetektionseinrichtungen, insbesondere die Integrationszeit, unabhängig voneinander eingestellt werden. Dies ist insbesondere bei der Detektion von einzelnen Fluorochromen bei der Fluoreszenzmikroskopie von biologischem Material von Vorteil, da sich hier die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fluorochromen oft um Größenordnungen unterscheiden. Ferner können die optischen Wellenlängenbereiche, welche zu detektieren sind, abhängig von der gewünschten Aufgabe individuell festgelegt werden, während sie bei einer Farbkamera fest vorgegeben sind. Ferner können hochauflösende CCD-Kameras zum Einsatz kommen, deren Pixelzahlen diejenigen von Farbkameras deutlich übersteigen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit derartiger simultaner Detektions- bzw.

Aufnahmekanäle mittels einer Vielzahl von Bilddetektionseinrichtungen besteht in der "tiefenaufgelösten" Detektion von "dicken" Objekten. Insbesondere bei mikroskopischen Präparaten ist es nämlich oft wünschenswert, Bilder aus unterschiedlichen Tiefenschichten des Präparats zu erhalten, d.h. aus Objektebenen, die in z-  
5 Richtung voneinander beabstandet sind. Eine Detektion in unterschiedlichen Fokusebenen kann auch erforderlich sein, um die Detektionssignale aus allen relevanten Objektschichten zu erfassen. Beispiele hierfür sind Gewebeschnitte oder Interphasekerne. Verwendet man beispielsweise drei Detektionskanäle, die jeweils  
10 justiert sind, so können drei Fokusebenen gleichzeitig aufgenommen werden. Das Prinzip ist auch auf mehr als drei Bilddetektionseinrichtungen erweiterbar. Die optische Abtastgeschwindigkeit für N erforderliche Fokusebenen läßt sich auf diese Weise um einen Faktor, welcher der Zahl der Aufnahmekanäle entspricht, reduzieren, soweit die Gesamtintensität des Detektionssignals dies im Hinblick auf  
15 die Empfindlichkeit der verwendeten Bilddetektionseinrichtungen zuläßt.

Die beschriebene Detektion in den unterschiedlichen Fokusebenen kann mit einem Mikroskopsystem erfolgen, welches schematisch in Figur 3 dargestellt ist. Soll keine zusätzliche simultane Aufnahme mehrerer Farbkanäle erfolgen, wie sie oben  
20 beschrieben wurde, werden farbneutrale Strahlteiler 50, 52 eingesetzt, welche das Detektionslicht ohne Farbaufspaltung geeignet auf die CCD-Kameras 40, 42 und 44 verteilen. Insbesondere spalten die Strahlteiler 50, 52 das optische Eingangssignal in zwei Strahlenbündel mit typischerweise 50% der Eingangssignalstärke auf. Um verschiedene Fokusebenen des Objekts mit den CCD-Kameras 40, 42 und  
25 44 scharf bzw. fokussiert abzubilden, können die geometrischen Weglängen entlang der jeweiligen Detektionspfade von den jeweiligen CCD-Kameras 40, 42 und 44 zu einer Objektebene unterschiedlich lang gewählt werden. In Figur 3 weist beispielsweise die CCD-Kamera 40 eine kürzere geometrische Weglänge zu dem  
30 Abstand entlang der jeweiligen Detektionspfade von dem Strahlteiler 50, bei welchem sich der gemeinsame Detektionsstrahlengang der verschiedenen CCD-Kameras teilt, zu der CCD-Kamera 40 kürzer als zu den CCD-Kameras 42 und 44. Dies hat zur Folge, daß die CCD-Kamera 40 eine Fokusebene des Objekts scharf

bzw. fokussiert abbildet, welche sich geringfügig gegenüber der Fokusebene unterscheiden wird, welche durch die Kameras 42 und 44 abgebildet wird. Eventuell zusätzlich oder auch anstelle des oben beschriebenen relativen Versatzes der CCD-Kameras können auch (nicht dargestellte) Zusatzoptiken vor zumindest einer  
5 der CCD-Kameras eingesetzt werden, um so die Festlegung der gewünschten Fokusebene zu bewirken.

Die analogen Kameraausgänge der CCD-Kameras 40, 42 und 44 können jeweils mit Signaleingängen einer (nicht dargestellten) Digitalisiereinrichtung bzw. -modul  
10 verbunden sein, welche für eine Multiplexverarbeitung von analogen Kamerasignalen ausgelegt ist. Eine solche Multiplexverarbeitung der einzelnen Kamerasignale ermöglicht vorteilhafterweise die kostengünstige Verwendung eines einzigen Digitalisiermoduls für mehrere Bilddetektionseinrichtungen. Zwar können in dieser Konfiguration die Signale der CCD-Kameras nicht zum gleichen Zeitpunkt  
15 ausgelesen und digitalisiert werden, jedoch bedeutet dies keine praktische Einschränkung. Zum einen ist die Auslesezeit einer CCD-Kamera mit einem Wert von typischerweise 0,1 Sekunden in der Regel kürzer als typische Detektionszeitdauern. Ferner sind die Detektionszeitdauern für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich lang, so daß das CCD-Kamerasignal des signalstärkeren Fluoreszenzfarbstoffs bereits ausgelesen werden kann, während die andere CCD-  
20 Kamera das intensitätsschwächere Signal noch detektiert und integriert. Durch eine geeignete Steuerung dieses Ablaufs läßt sich erreichen, daß die Gesamtaufnahmezeit nur durch die erforderliche Detektionszeit für den intensitätsschwächsten Fluoreszenzfarbstoff begrenzt wird.

### Ansprüche

1. Mikroskopsystem zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, welches zumindest zwei bevorzugt elektrische, elektronische und/oder photographische Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) umfaßt, die zur gleichzeitigen speicherfähigen Detektion eines Detektionsbereichs des Objekts ausgelegt sind.
2. Mikroskopsystem nach Anspruch 1, wobei die Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) zumindest eine vorzugsweise hochauflösende CCD-Kamera umfassen und/oder ausgelegt sind, daß jeweilige Detektionszeitdauern unabhängig voneinander einstellbar sind.
3. Mikroskopsystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine erste (40) der Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) den Detektionsbereich in einer ersten Objektfokusebene und eine zweite (42) der Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) den Detektionsbereich in einer zweiten Objektfokusebene detektiert, wobei die erste und die zweite Objektfokusebene relativ zueinander entlang einer optischen Detektionsachse des Mikroskopsystems versetzt sind.
4. Mikroskopsystem nach Anspruch 3, wobei die erste (40) und die zweite (42) Bilddetektionseinrichtung um unterschiedliche geometrische Weglängen entlang der jeweiligen optischen Detektionspfade von der ersten Objektfokusebene beabstandet sind.
5. Mikroskopsystem nach Anspruch 3 oder 4, wobei zumindest eine der Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) eine Zusatzoptik zur Einstellung der



jeweiligen Objektfokusebene umfaßt.

6. Mikroskopsystem nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei eine erste (40) der Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) zur Detektion eines ersten und eine zweite (42) der Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) zur Detektion eines zweiten optischen Wellenlängenbereichs ausgelegt ist.
7. Mikroskopsystem nach Anspruch 6, wobei die erste Bilddetektionseinrichtung (40) eine erste Kamera und einen dichroitischen Strahlteiler (50) und die zweite Bilddetektionseinrichtung (42) eine zweite Kamera umfaßt, wobei der Strahlteiler (50) derart ausgelegt und im Detektionsstrahlengang angeordnet ist, daß Detektionsstrahlen des Detektionsbereichs in dem ersten Wellenlängenbereich per Transmission durch den Strahlteiler (50) auf die erste Kamera und Detektionsstrahlen des Detektionsbereichs in dem zweiten Wellenlängenbereich per Reflexion an dem Strahlteiler (50) auf die zweite Kamera fallen.
8. Mikroskopsystem zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, bevorzugt nach einem der vorangegangenen Ansprüche, welches zumindest eine Objektbeleuchtungseinrichtung (14, 16; 46), zumindest eine Bilddetektionseinrichtung (20, 22; 40, 42, 44) zur Detektion von Detektionsbereichen des Objekts innerhalb einer Detektionszeitdauer  $t_{\text{detektion}}$  und eine Objektverschiebeeinrichtung (12) zur Verschiebung des Objekts umfaßt, wobei die Objektverschiebeeinrichtung (12) zu einer Verschiebung des Objekts mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit ausgelegt ist, so daß nach einer Verschiebezeit  $t_{\text{verschieb}}$  das Objekt um einen Detektionsbereich verschoben ist, wobei  $t_{\text{detektion}}$  einen Bruchteil von  $t_{\text{verschieb}}$  beträgt.
9. Verfahren zur optischen Abtastung von Objekten, insbesondere unter Fluoreszenzbedingungen, mittels eines Mikroskopsystems, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei ein Detektionsbereich des Objekts mit zumindest zwei Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) gleichzeitig spei-

cherfähig detektiert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Bilddetektionseinrichtungen (40, 42, 44) den Detektionsbereich gleichzeitig in zumindest zwei unterschiedlichen Objektfokusebenen detektieren, welche entlang einer optischen Detektionsachse des Mikroskopsystems versetzt sind, und/oder den Detektionsbereich in zumindest zwei zumindest bereichsweise unterschiedlichen optischen Wellenlängenbereichen detektieren.
11. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Detektion von markiertem, insbesondere fluoreszenzmarkiertem biologischem Material in einer Probe, wobei das biologische Material insbesondere Zellen und/oder Bestandteile davon umfaßt.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei das Verhältnis von nicht-markiertem zu dem markierten biologischen Material mehr als  $10^4$ , insbesondere mehr als  $10^6$  beträgt.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 oder 12, wobei das biologische Material durch mehrere unterschiedliche Markierungen, insbesondere Fluoreszenzmarkierungen markiert ist.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei das biologische Material durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und/oder fluoreszenzmarkierte Antikörper und/oder Nukleinsäure-bindende Fluoreszenzfarbstoffe markiert ist.

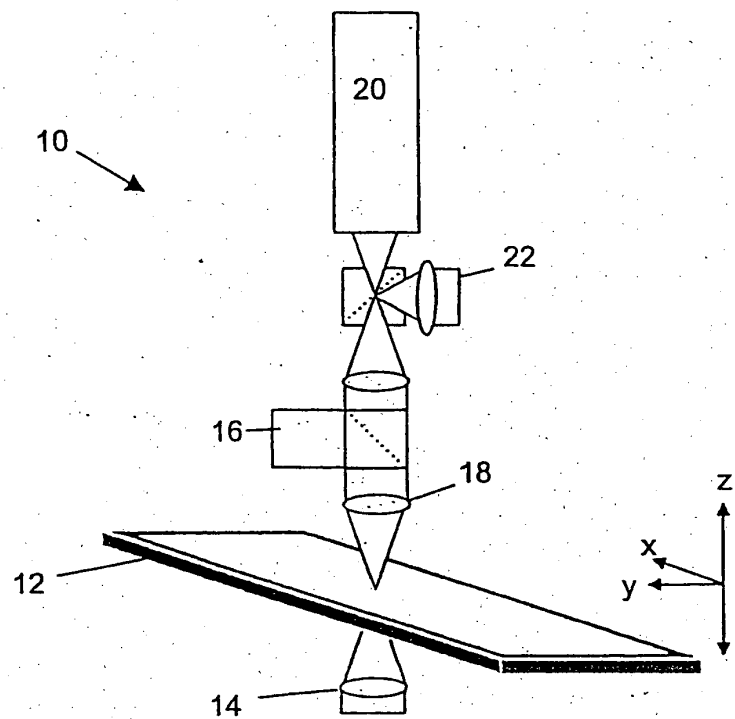


Fig. 1

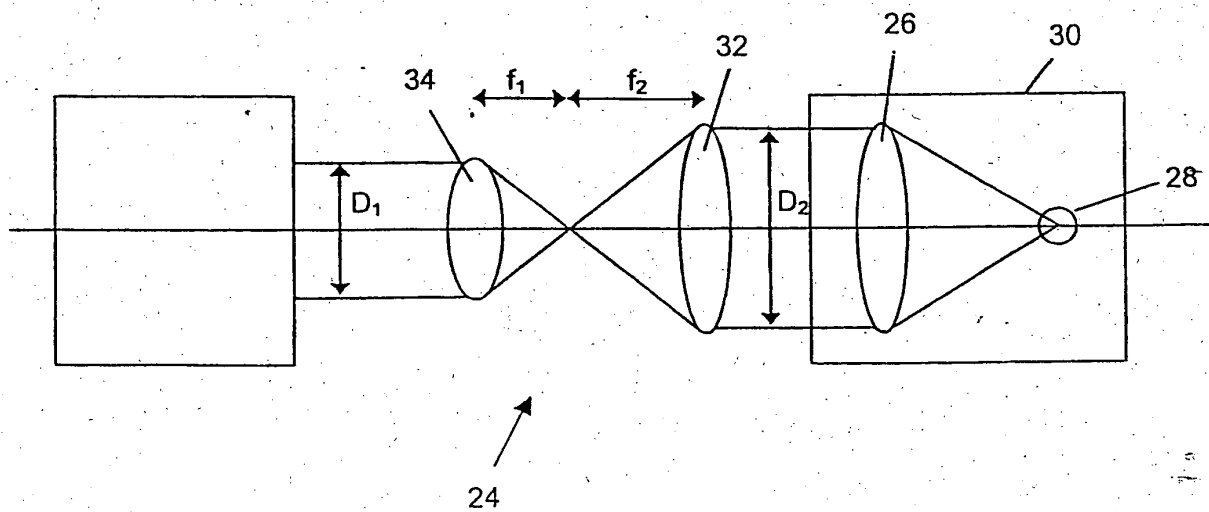


Fig. 2

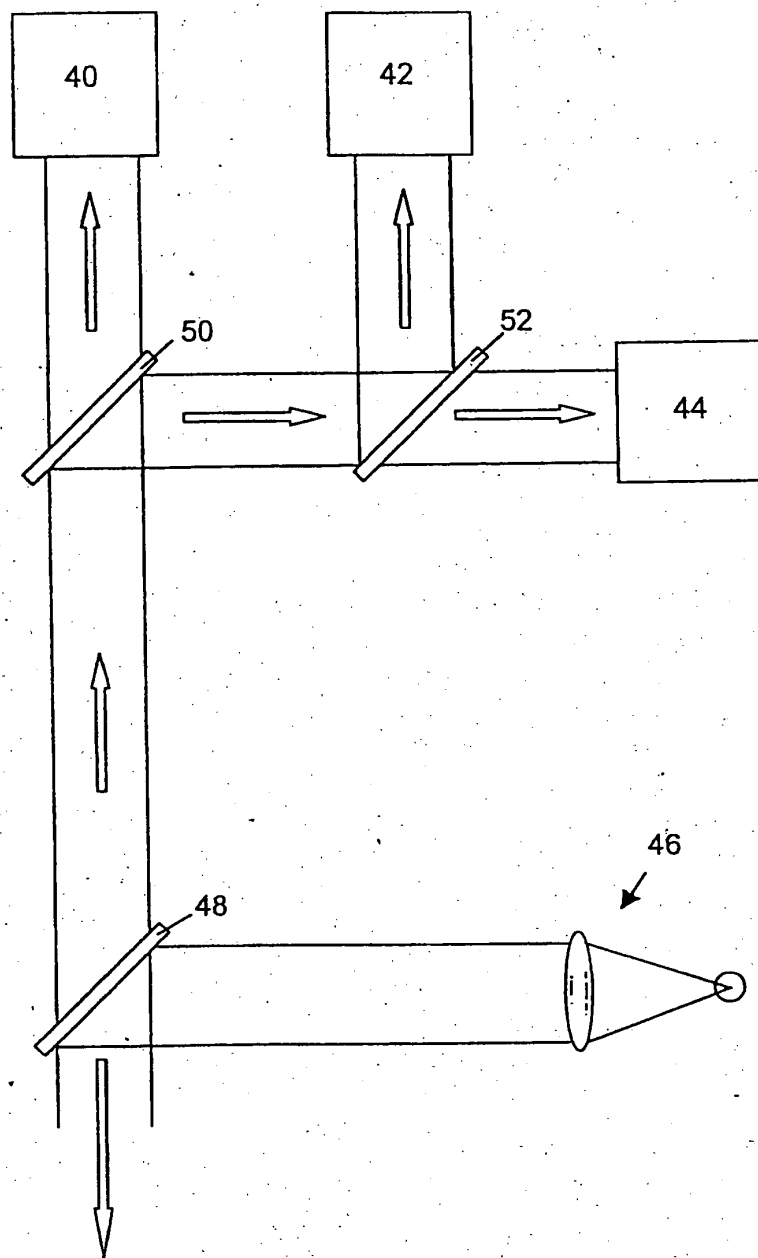


Fig. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/EP 00/04115

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N21/64 G02B21/18 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 557 871 A (CELL ANALYSIS SYSTEMS INC) 1 September 1993 (1993-09-01)  column 7, line 18 -column 9, line 15; figure 2 column 10, line 36 - line 54 -----	1,6,7, 9-11,13, 14
X	WO 90 10276 A (CELL ANALYSIS SYSTEMS INC) 7 September 1990 (1990-09-07)  page 4, line 3 - line 18 page 10, line 1 - line 25; figure 1 page 13, line 7 - line 25; figure 3 page 45, line 24 -page 46, line 7; figure 23 ----- -/-	1,6,7, 9-11,13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

22/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ciarrocca, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/EP 00/04115

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 4 847 910 A (SAKURABA SHINICHI ET AL) 11 July 1989 (1989-07-11)</p> <p>column 3, line 54 -column 5, line 1; figure 1 column 7, line 34 -column 8, line 7; figure 7</p>	1,6, 9-11,13, 14
X	<p>US 5 187 749 A (SUGIMOTO YUKIHIRO ET AL) 16 February 1993 (1993-02-16) abstract column 4, line 5 - line 34; figure 1 column 5, line 38 - line 41 column 8, line 3 - line 10; figure 14 column 9, line 19 - line 24</p>	1,9,11, 13,14
X	<p>US 5 481 401 A (KITA NOBUHIRO ET AL) 2 January 1996 (1996-01-02) column 7, line 45 -column 8, line 14; figure 1 column 9, line 39 - line 53</p>	1,2,6,7, 9,10
X	<p>WO 93 16439 A (NEOPATH INC) 19 August 1993 (1993-08-19) page 5, line 6 - line 25; figure 1 page 8, line 28 -page 9, line 1 page 10, line 13 -page 11, line 7; figure 3</p>	1-5,8-10
X	<p>DE 11 01 807 B (CARL ZEISS) 9 March 1961 (1961-03-09) the whole document</p>	1,3,4
X	<p>EP 0 557 558 A (MITSUI MINING &amp; SMELTING CO) 1 September 1993 (1993-09-01) abstract; figure 1</p>	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04115

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0557871 A	01-09-1993	US 5428690 A CA 2089518 A EP 0798550 A JP 6281553 A	27-06-1995 19-08-1993 01-10-1997 07-10-1994
WO 9010276 A	07-09-1990	US 4998284 A AT 153154 T CA 2045172 A,C DE 69030733 D DE 69030733 T EP 0534948 A EP 0709667 A ES 2100882 T JP 5501151 T US 5134662 A	05-03-1991 15-05-1997 25-08-1990 19-06-1997 22-01-1998 07-04-1993 01-05-1996 01-07-1997 04-03-1993 28-07-1992
US 4847910 A	11-07-1989	JP 1937848 C JP 6068491 B JP 63009864 A DE 3777465 A EP 0251281 A	09-06-1995 31-08-1994 16-01-1988 23-04-1992 07-01-1988
US 5187749 A	16-02-1993	JP 3291567 A	20-12-1991
US 5481401 A	02-01-1996	JP 5127096 A	25-05-1993
WO 9316439 A	19-08-1993	AU 3723993 A US 5912699 A	03-09-1993 15-06-1999
DE 1101807 B		NONE	
EP 0557558 A	01-09-1993	US 5298963 A DE 69220474 D DE 69220474 T	29-03-1994 24-07-1997 05-02-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04115

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N21/64 G02B21/18 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 557 871 A (CELL ANALYSIS SYSTEMS INC) 1. September 1993 (1993-09-01)  Spalte 7, Zeile 18 - Spalte 9, Zeile 15; Abbildung 2 Spalte 10, Zeile 36 - Zeile 54	1,6,7, 9-11,13, 14
X	WO 90 10276 A (CELL ANALYSIS SYSTEMS INC) 7. September 1990 (1990-09-07)  Seite 4, Zeile 3 - Zeile 18 Seite 10, Zeile 1 - Zeile 25; Abbildung 1 Seite 13, Zeile 7 - Zeile 25; Abbildung 3 Seite 45, Zeile 24 - Seite 46, Zeile 7; Abbildung 23  --- -/-	1,6,7, 9-11,13, 14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ciarrocca, M



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04115

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 847 910 A (SAKURABA SHINICHI ET AL) 11. Juli 1989 (1989-07-11)  Spalte 3, Zeile 54 - Spalte 5, Zeile 1; Abbildung 1 Spalte 7, Zeile 34 - Spalte 8, Zeile 7; Abbildung 7	1,6, 9-11,13, 14
X	US 5 187 749 A (SUGIMOTO YUKIHIRO ET AL) 16. Februar 1993 (1993-02-16) Zusammenfassung Spalte 4, Zeile 5 - Zeile 34; Abbildung 1 Spalte 5, Zeile 38 - Zeile 41 Spalte 8, Zeile 3 - Zeile 10; Abbildung 14 Spalte 9, Zeile 19 - Zeile 24	1,9,11, 13,14
X	US 5 481 401 A (KITA NOBUHIRO ET AL) 2. Januar 1996 (1996-01-02) Spalte 7, Zeile 45 - Spalte 8, Zeile 14; Abbildung 1 Spalte 9, Zeile 39 - Zeile 53	1,2,6,7, 9,10
X	WO 93 16439 A (NEOPATH INC) 19. August 1993 (1993-08-19) Seite 5, Zeile 6 - Zeile 25; Abbildung 1 Seite 8, Zeile 28 - Seite 9, Zeile 1 Seite 10, Zeile 13 - Seite 11, Zeile 7; Abbildung 3	1-5,8-10
X	DE 11 01 807 B (CARL ZEISS) 9. März 1961 (1961-03-09) das ganze Dokument	1,3,4
X	EP 0 557 558 A (MITSUI MINING & SMELTING CO) 1. September 1993 (1993-09-01) Zusammenfassung; Abbildung 1	8

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04115

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0557871 A	01-09-1993	US 5428690 A CA 2089518 A EP 0798550 A JP 6281553 A	27-06-1995 19-08-1993 01-10-1997 07-10-1994
WO 9010276 A	07-09-1990	US 4998284 A AT 153154 T CA 2045172 A,C DE 69030733 D DE 69030733 T EP 0534948 A EP 0709667 A ES 2100882 T JP 5501151 T US 5134662 A	05-03-1991 15-05-1997 25-08-1990 19-06-1997 22-01-1998 07-04-1993 01-05-1996 01-07-1997 04-03-1993 28-07-1992
US 4847910 A	11-07-1989	JP 1937848 C JP 6068491 B JP 63009864 A DE 3777465 A EP 0251281 A	09-06-1995 31-08-1994 16-01-1988 23-04-1992 07-01-1988
US 5187749 A	16-02-1993	JP 3291567 A	20-12-1991
US 5481401 A	02-01-1996	JP 5127096 A	25-05-1993
WO 9316439 A	19-08-1993	AU 3723993 A US 5912699 A	03-09-1993 15-06-1999
DE 1101807 B		KEINE	
EP 0557558 A	01-09-1993	US 5298963 A DE 69220474 D DE 69220474 T	29-03-1994 24-07-1997 05-02-1998